大豆種皮色素轉移基因 GST 之選殖與表現分析

黃靖雯 [1]、古新梅 [2]、曾東海 [1]、王強生 [1*]

[1]行政院農業委員會農業試驗所農藝組

[2]國立中興大學農藝學系

摘要

利用大豆EST基因庫中穀胱苷肽轉移酶(glutathione-S-transferase)(GST2，Y10820)基因序列設計特異核酸引子組，進行逆轉錄酶鏈合反應(RT-PCR)，獲得 GST2 之基因片段 GST420 殖系。經序列分析及基因庫比對確認後，用以篩選黑色(*iRT* 基因型)大豆青仁烏豆(CRWD)種皮之 cDNA 基因庫，共得到二個完整的 GST cDNA 殖系 GST11-1 (AY382831, 926 bp)與 GST70-1(AY382832, 930 bp)，分別編碼具有 219 個及 216 個胺基酸的蛋白質。由蛋白質結構分析顯示，二殖系均具有 GST 共同之 N 端與 C 端 domain 及與 glutathione 結合之 G-site 等三個保留區，依特性分類應屬於第三群之 GST 基因。以七個不同 *I*, R, T 基因型組合之 Clark 近同源品系進行南方雜交(Southern hybridization)結果顯示，在大豆基因組中 GST 基因至多為二套，且未發現多型性。由北方分析(Northern hybrid-dization)結果發現，此二個 GST 基因在種皮的全生育時期及葉部均有表現，但在花及豆莢組織中並未偵測到基因的表現或是表現量極低。由於在大豆 EST 基因庫中仍有其他 GST 基因相關殖系存在，因此在花瓣組織中是否另有專一性表現之 GST 基因，扮演花青素轉移之角色仍有待研究。

關鍵詞：種皮、大豆、色素基因、穀胱苷肽轉移酶。

Cloning and Characterization of Pigment Transportation Gene — Glutathione S-transferase (GST) from Soybean Seed Coat

Ching-Wen Huang[1], Hsin-Mei Ku[2], Tung-Hai Tseng[1] and Chang-Sheng Wang [1*]

[1] Division of Agronomy, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan (ROC)

[2] Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung 402, Taiwan (ROC)

ABSTRACT

Primers specific for GST gene (GST2, Y10820) were synthesized according to the results of soybean EST database search. Expected cDNA fragment GST420 was amplified from total RNA extracted from soybean seed coats of CRWD variety with *iRT* genotype for experiment. Sequence analysis of GST cDNA fragment confirmed that a partial GST gene fragment was cloned. Two complete cDNA clones, GST11-1 (926 bp, AY382831) and GST70-1 (930 bp, AY382832) of type III GST were obtained by screening the cDNA library with GST420 fragment. The deduced amino acid sequences showed 41-100%

* 通信作者，cswang@wufeng.tari.gov.tw

投稿日期：2005 年 1 月 21 日

接受日期：2005 年 3 月 15 日

作物、環境與生物資訊 2:221-238 (2005)

Crop, Environment & Bioinformatics 2:221-238 (2005)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan (ROC)

identity to ten registered GST proteins by Blast analysis of NCBI. Southern blot analysis indicated that two copies of GST were presented in the genome of Clark isogenic lines with no polymorphism. Northern hybridization showed that these two GST genes expressed in the seed coats and leaves, but not expressed in flowers. Further experiment will be conducted to study the function of GST genes in these tissues.

Key words: Seed coat, Soybean, Pigment gene, Glutathione-*S*-transferase (GST).

前言

當暴露在污染的環境下，許多細胞會進行氧化還原反應以自我防衛、解毒或排毒，而穀胱苷肽轉移酶 (glutathione S-transferase, GST)即是參與這類反應的酵素之一。在動物研究方面 GST 首先被發現具有代謝毒物質的解毒功能；而 1970 年代植物的 GST 則因發現其對除草劑有解毒功能，隨後即被廣泛的研究(Wilce and Parker 1994, Edwards and Dixon 2000)。各種基因表現分析及基因組定序計畫顯示，GST 基因在植物體內通常以基因家族方式存在，推測可能係演化過程中基因倍加所造成(Edwards *et al.* 2000)，而長期演化結果亦造成 GST 具有許多特化的功能。GST 在植物體中主要參與逆境反應、結合或隔離作用、一次及二次代謝物之代謝途徑和訊息傳導等功能(Dixon *et al*. 2002)，而植物 GST 可辨識的受質則包括外來的化合物以及植物內生的代謝產物。

植物二次代謝物以酚類化合物為主，其中又以類黃酮(flavonoids)最具代表性。花青素(anthocyanins)為類黃酮之一類，其結構主由氫、碳、氮、氧組成，一般均為大分子且具有許多環狀結構，係具有吸光性之酚類化合物，累積在植物組織的液泡以提供各種顏色。大豆種皮之色素合成可能分成二階段完成，在幼嫩時期會先累積原花色素(proanthocyanidins) (由無色花青素配基或花青素配基縮合而成)(Todd and Vodkin 1993)在液泡內，成熟期才經由水解酵素及 UFGT(UDP-glucosyl transferase)酵素之作用合成花青素。由於這些酚類化合物會與植物的蛋白質結合，因此對植物體本身亦為一種有毒物質，需加以轉移、隔離，以維持細胞正常功能。由玉米 *Bronze*-2(*Bz*2)基因座突變體試驗發現其編碼 GST 酵素，可將花青素由細胞質轉移到表皮細胞的液泡內隔離，使該部位表現顏色 (Marrs *et al.* 1995)。此一過程不需穀胱苷肽(glutathione, GSH)的參與，故目前亦將 GST 稱為花青素轉移蛋白(Mueller *et al*. 2000)。目前有關大豆 GST 基因的生化功能尚未有詳細的研究，因此本試驗以具有完整類黃酮代謝途徑的黑色種皮大豆青仁烏豆(Chin-Ren-Woo-Dow，CRWD)品種為材料，依據已發表的大豆 GST2(Y10820)基因設計專一性引子，以逆轉錄酶鏈合反應選殖 GST2 基因片段，以不同 *IRT* 基因型組合之 Clark 大豆近同源品系為材料，利用北方雜交及南方雜交反應探討 GST 基因於不同部位、各發育時期的表現情形及其在基因組中的套數與構造。並篩選青仁烏豆種皮 cDNA 基因庫，選殖完整的 cDNA，以提供未來花色改造之利用。

材料與方法

植物材料

大豆種皮色素的生成主要受 *I*、*R*、*T* 三個基因座控制(Wang *et al*. 1994)，已知 *I* 基因座為抑制子，其具有四個對偶基因(*I*、i^i、i^k 及 *i*)，控制花青素之生合成。目前已知同質顯性 *I* 基因會抑制 chalcone synthase(CHS)生成，進而抑制花青素之生合成(Wang *et al*. 1994)。*R* 基因座亦會影響

種皮色素之生成，其具有三個對偶基因 *R*、*r-m*、*r*，其顯隱性關係為 *R*＞*r-m*＞*r*。此外，除上述三對偶基因外，尚有一個不穩定基因，可突變成 *R**或 *r**及 *rm55*(用以區別原 *r-m*)，於外表型僅有種皮可供作辨識之性狀。然而，目前對於造成不穩定基因突變之機制仍不清楚。大豆 *T* 基因座為一個多效性基因座，除控制種皮和種臍顏色生成外，對絨毛和下胚軸之顏色表現亦有影響(Buzzell and Buttery 1982)。隱性 *t* 對偶基因之另一影響為使不完全黑(*iRt*)和 buff(*irt*)種皮具有不規則裂痕之特性有關(William 1952)。Buzzell *et al.* (1987)利用高效率液相層析技術(HPLC)及薄層色層分析(TLC)分析結果發現，*TTW1W1* 均有矢車菊素配糖體(cyanidin 3-glucoside)及飛燕草素配糖體(delphenidin 3-glucoside)，氏等發現 *TTw1w1* 僅有矢車菊素配糖體存在，而 *ttW1W1* 則有飛燕草素配糖體。因此，推測 *T* 基因座控制天竺葵素配基羥基化成矢車菊素配基，即可能為編碼 F3′H 基因。最近 Zabala and Vodkin (2003)利用 RFLP 技術，證明了 *T* 基因座編碼 F3′H 基因。

本試驗選用大豆(*Glycine max*)青仁烏豆(Chin-Ren-Woo-Dow，CRWD)品種及 Clark 近同源品系(near isogenic lines)為材料，所有試驗材料均種植於行政院農委會農業試驗所之試驗田或溫室，所有大豆品系之 *I*、*R*、*T* 基因座均為同質型，因此本論文或圖表均只以一個對偶基因表示。

大豆基因組 DNA 及總量 RNA 萃取

本試驗依據並修改 Sambrook *et al.* (1989) CsCl / ethidium bromide 梯度離心的方法，萃取大豆基因組 DNA (Wang and Vodkin 1994)。依據 Wang and Vodkin (1994)所發表之 BSA-PVPP-PK 方法，可有效抑制 proanthocyanidins-RNA 的鍵結，獲得高品質的 RNA。純化後的大豆種皮 RNA，供青仁烏豆種皮 cDNA 基因庫之建立、逆轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)及北方雜交等試驗。

核酸引子之設計

在已發表之大豆 GST 中，僅有 *GmGST26A*(又稱 *GmHsp26A* 或 *GH2/4*，M20363)經由轉殖試驗確認與植物體內花青素之轉移功能有關(Alfenito *et al.* 1998)。然而，目前大豆 EST 資料庫中約有 113 個相關殖系，其生理或生化功能尚不清楚，本研究自其中選取已註冊之 GST 基因(GST2, Y10820)進行選殖及相關功能之研究。由 GST2 之 cDNA 序列設計正向 GST1：5′-CTTGAATCTTCGTTATCCTT-3′及反向 GST2R：5′-GGAGAAGAAAAAGAACT-3′二個專一性引子，擬選殖之片段為 420 bp。

逆轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)及產物之選殖

以 1 μg 的青仁烏豆種皮總量 RNA 為模板及 2 μM 的專一性引子進行 RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega Co., USA) 反應，結果於不同鏈合溫度(37℃及 45℃) 之反應中，經電泳膠體確定有預期片段之產生，因此自膠體上回收並純化此片段以 pGEM-T easy 載體(Promega Co.)進行選殖。

大腸菌的轉型係修改自 Chung *et al.* (1989)的方法，使用的寄主菌體為大腸桿菌 JM109 菌系，並依據“10-Min Mini Prep” (Zhou *et al.* 1990) 的方法進行質體 DNA 的抽取，篩選出符合預期片段的殖系。

南方雜交(Southern hybridization)**及北方雜交**(Northern hybridization)

取大豆(*Glycine max*)Clark 不同基因型組合(*iRT*、*iRt*、*irT*、*irt*、*iRTw1*、*iR*T*、*ir*T*)之近同源品系之基因組 DNA 各 15 μg，分別以不同限制酵素 (NEB, 20 U)進行完全切割。利用毛細原理將 DNA 轉漬至 nylon 膜上約作用 12-16 小時，再以 UV crosslinker (1200×100 μJ cm^{-2})(Stratagene, Co.)將 DNA 固定在 nylon 膜上，陰乾後供核酸雜交分析。

北方雜交分析係取前述青仁烏豆及 Clack 近同源品系不同生育時期之種皮，萃取總量 RNA 20 μg 於 70℃下反應 10 分鐘以去除二級結構，置於冰上 3 分鐘，經 1.2 % agarose(含 3 % formaldehyde)膠體電泳分離後，將膠體浸泡於 10× SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-citrate, pH 7.0)30 分鐘，並依前述南方轉漬方法進行轉漬 12-16 小時，以 UV-crosslinker 將 RNA 鍵結於 nylon 膜上，陰乾後供核酸雜交分析。

青仁烏豆種皮 cDNA 基因庫之建立

依前述獲得青仁烏豆種皮 (200-400 mg 時期) 之高品質總量 RNA，以 Dynabeads mRNA 抽取試劑組 (Dyna Co.)，抽取約 5 μg mRNA，並依據 Uni-ZAP XR cDNA 合成組 (Stratagene Co.) 建議之方法，構築 cDNA 基因庫，供全長 GST cDNA 之篩選。

篩選 GST 基因之全長 cDNA

1.基因庫大小之測定(titering)

挑 XLI-Blue MRF′單一菌落接種於含 0.2% maltose 及 10 mM $MgSO_4$ 之 LB 培養液中，離心收集菌體後懸浮於培養液一半體積之 10 mM $MgSO_4$ 中，再分裝 200 μl 到離心管中，加入以 SM 溶液 [100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01 % gelatin] 稀釋 100 倍的 cDNA 基因庫噬菌體混合均勻後，37℃ 下靜置 15 分鐘以利噬菌體吸附於宿主菌體表面，再加入 2.5 ml 48℃之 NZY top agar (0.5 M NaCl, 1% NZ amine, 0.5% yeast extract, 0.2% $MgSO_4$, 0.7% agarose, pH 7.5)，平舖(plating)在已回溫的 NZY 平板培養基(0.5 M NaCl, 1% NZ amine, 0.5% yeast extract, 0.2% $MgSO_4$, 1.5% bactoagar, pH7.5)，待凝固後倒置於 37℃ 培養 12 小時至溶菌斑(plaque)長至 1-2 mm 大小再行估計。

2.溶菌斑之粘取(plaque lifting)

溶菌斑的粘取係依照 Uni-ZAP XR Library Construcion Kit (Stratagene Co.) 的操作手冊進行，粘取完成後待濾膜稍加風乾，再以 UV crosslinker 將噬菌體 DNA 固定於 nylon 濾膜上，即可以前述南方雜交方法進行雜交反應；共進行三次篩選且雜交係在 68℃ 下進行，並以 55℃ 進行高嚴格度的清洗。

生體內剪接作用(*in vivo* excision)

將第三次篩選出具有雜交反應訊號之溶菌斑，自 NZY 平板培養基中挖起置於 500 μl SM buffer 在 4℃下隔夜將噬菌體溶出。依前述方法準備宿主細胞 XLI-Blue MRF′ 及 SOLR。將噬菌體溶液與 XLI-Blue MRF′ 及 1 μl ExAssist 協力噬菌體(helper phage；$>10^7$ pfu μl^{-1})均勻混合，置於 37℃ 15 分鐘，加入 3 ml 的 LB 培養液於 37℃震盪培養 2.5-3 小時後，置於 70℃處理 20 分鐘殺死宿主細菌，再以 2 K rpm 離心 15 分鐘去除菌體殘渣。將上清液轉至新的

微量離心管，取出 3 µl 含 phagemid 環狀雙股 DNA，分別與 200 µl SOLR 宿主細胞均勻混合，再置於 37℃放置 20 分鐘，塗勻於 LB/Amp 的平板培養基上。於 37℃培養過夜，挑單一菌落培養於 LB/Amp 培養液，並依照前述方法進行少量質體 DNA 的抽取及限制酵素切割，以區分嵌入 DNA 及載體 DNA，並估算嵌入 DNA 之大小。

DNA 定序分析

1.定序樣品之製備

依據 Cycle sequencing 的原理 (Murray 1989)，使用由 Epicentre Tenchnologies Co. 所生產的 SequiTherm EXCEL ™ II DNA Sequencing Kit-LC，並以 Sequencer 4200 (LI-COR, Inc.)機器進行核酸定序。

2.定序電泳膠之製備

將定序用玻璃組(LI-COR, Inc.)擦拭乾淨，即可將玻璃組裝注膠。5.5 % Long Ranger™ 膠體溶液之組成：7 M 尿素(urea, Amresco)，6 ml 10× TBE 及 6.6 ml 的 50 % Long Ranger (FMC)進行溶解混合，最後加水定量至 60 ml，加入 10 % APS 400 µl 及 40 µl TEMED 混合均勻後進行注膠。

核酸自動定序儀之操作

設定 e-Seq 軟體 (LI-COR, Inc.)後，將已凝結的聚丙醯胺膠架於 Sequencer 4200 (LI-COR, Inc.)機器上，分別裝好上下電泳槽。將樣品依序注入槽中進行電泳分析，最後進行 post-Sequencing 分析，得到的核酸序列因包含載體序列，經切除後即可作序列分析。

核酸序列分析

本試驗所使用之生物資訊軟體分析工具及網址詳列如下：

1. CLUSTAL W http://workbench.sdsc.edu/CGI/BW.cgi (Thompson *et al.* 1994)-多序列排比。

2. RPSBLAST http://workbench.sdsc.edu/CGI/BW.cgi (Altschul *et al.* 1997)-尋找蛋白質保留區域。

3.ORF Finder http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html -預測 open reading frame 位置。

4.BLAST® http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/－以 Local Alignment 比對方式進行氨基酸或核酸序列之比對。

5.Translation http://tw.expasy.org/－核酸序列轉譯成氨基酸序列。

6. Compute pI/Mw tool http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (Bjellqvist *et al.* 1993) -計算一轉譯氨基酸之 p*I* 值及分子量。

結果與討論

一、GST 基因片段之選殖

目前在 EST 資料庫中大豆約有 113 個相關殖系(2004 年，NCBI 資料庫)，其生理或生化功能尚不清楚。本實驗自其中選取 glutathione transferase (GST2, Y10820)作為選殖之目標，希望獲得 GST 殖系，探討 GST 酵素與色素轉移之關係。由 GST2 cDNA 序列，設計正向 GST1 及反向 GST2R 專一性引子進行逆轉錄聚合酶鏈鎖反應，預期片段為 420 bp，並將該殖系命名為 GST420。以 NCBI 網站中 BLAST 程式 (Altschul *et al.* 1997)進行基因庫比對分析，結果確認殖系 GST420 即為欲選殖之 GST2 的片段，兩者核酸序列完全一致。故以此殖系作為探針，分別進行近同源品系的北方雜交、南方雜交，同時篩選青仁烏豆種皮 cDNA 基因庫以獲得其全長的 cDNA。

二、南方雜交分析

許多大豆色素生合成途徑中之基因尚未被定出功能，為探討本試驗所選殖之 GST 與大豆中 *I, R, T, W1* 等基因座之相關性，故選取大豆 Clark 近同源品系基因組 DNA 各 15 μg，分別以 *Sst* I、*Hin*d III、*Taq* I 酵素進行切割，並以 GST420 為探針進行南方雜交分析，分析其是否具有多型性。結果顯示，在不同 *IRTW1* 基因型組合之 Clark 近同源品系中，GST 基因至多為二套，且不同基因型組合並未觀察到 RFLP 多型性，顯示此一選殖的 GST 基因與 *iRT* 及 *w1* 等基因座間應無相關性存在，亦即 GST 基因不是這四個基因座所譯碼(Fig. 1)。

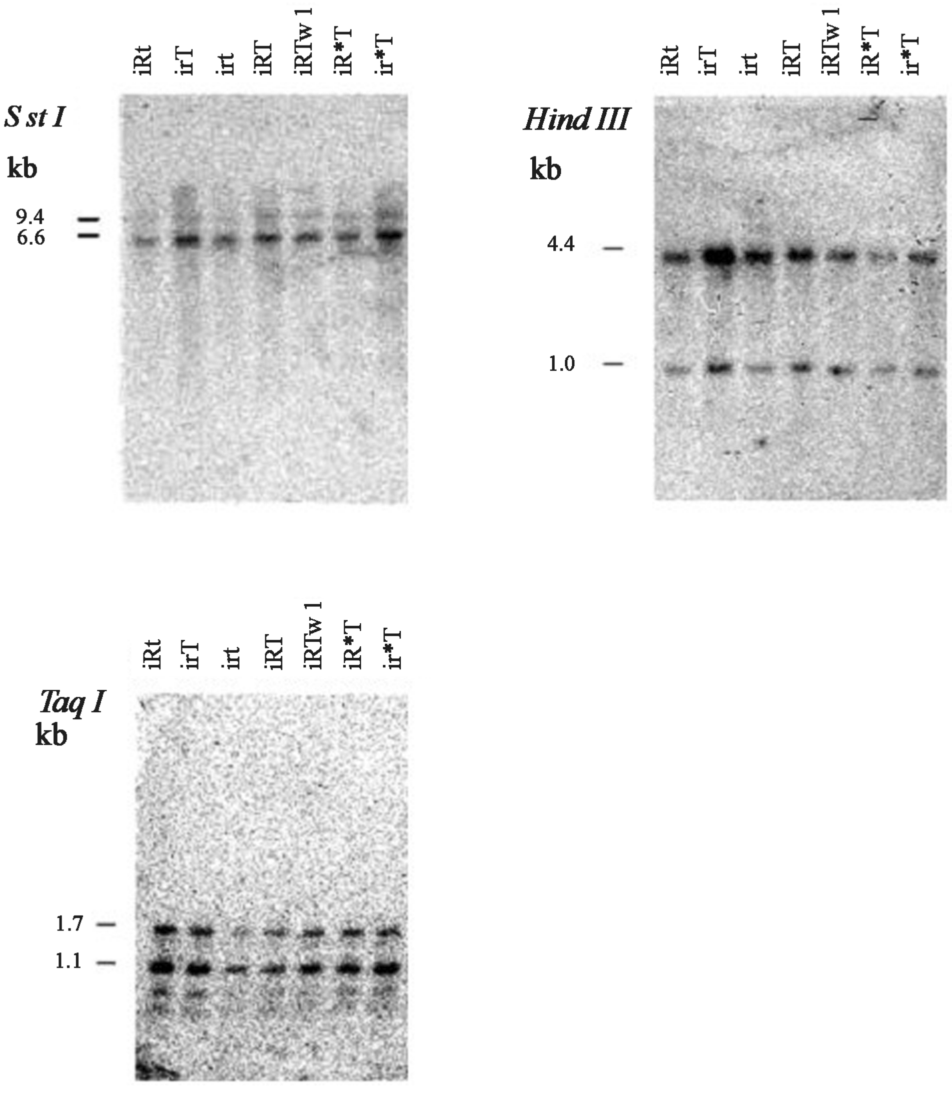

Fig. 1. Southern analysis of soybean genomic DNA from Clark isogenic lines digested with *Sst* I, *Hind* III, *Taq* I, fractionated on 0.8% agarose gels, transferred to nylon membrane and hybridized with probe, a GST420 cDNA fragment.

三、青仁烏豆 cDNA 基因庫之篩選及全長 cDNA 殖系之選殖

以 GST420 cDNA 片段作為探針，篩選青仁烏豆種皮(200-450 mg)cDNA 基因庫。先取 180,000 pfu 之噬菌體進行初步篩選，共得 4 個具雜交訊號之溶菌斑，接著第二次篩選得到 35 個溶菌斑，而第三次篩選則確認 94 個具正反應訊號。將所有殖系的核酸序列經由 NCBI 網站進行基因庫比對分析，發現共選殖到兩個不同的完整 cDNA 序列的 GST 基因，分別命名為 GST11-1 (AY382831) 及 GST70-1(AY382832) (Fig. 2)。GST11-1 具有 926 bp，包含 660 bp 的 ORF，可編碼一個由 219 個胺基酸組成的蛋白，並含 54 bp 的 5'端非轉譯區(UTR)及 212 bp 的 3'端非轉譯區；GST70-1 殖系則具有 930 bp，包含 651 bp 的 ORF，編碼一含 216 個胺基酸的蛋白，並含 45 bp 的 5'端及 234 bp 的 3'端非轉譯區。

由於 GST11-1 殖系與 GST70-1 核酸序列具有一致性，因此在篩選 cDNA 基因庫時亦被選殖，其與已註冊的大豆 GST10 (AF243365)之一致性達 99 ％，GST11-1 在 3'端非轉譯區較 GST10 之 cDNA 序列少 11 bp。其中 GST11-1 第 270 位置為 G，而 GST10 則為 R(A 或 G)，顯示可能亦為不同基因之單核酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)；然而各 ORF 所編碼之氨基酸序列與大豆(GST10)等十個物種之一致性為 100 - 50 ％ (Table 1)。此二 GST 全長 cDNA 殖系之差異可作為基因表現分析及品種鑑定之依據。將同源探針篩選種皮 cDNA 基因庫所獲得的 94 個殖系經分群比對後，發現其中有 87 個為 GST11-1 及 GST70-1。顯然此二殖系在黑色大豆種皮中之表現量遠較已註冊之 GST2 或 GST10 高，推測應與種皮色素之大量合成密切相關。

GST70-1 殖系之核酸序列與預期選殖之 GST2(Y10820)殖系之一致性達 99 ％ ，在 5'端非轉譯區較 GST2 少 7 bp，於 3'端非轉譯區則多了 15 bp。經序列排比分析發現 GST70-1 第 20、603、667、709、729、770 等六個位置與 GST2 有單核苷酸多型性現象(Fig. 3)，其中第 770 個位置則是較 GST2 多了一個鹼基造成 frame shift，因而造成所編碼的氨基酸亦產生差異，即第 187 氨基酸由 M(ATG)變成 L(CTG)；第 208 氨基酸則由 G(CAG)變成 D(GAC)，雖然 GST70-1 與 GST2 二核酸序列有很高之一致性，卻為不同之殖系，這些 SNP 將可以作為鑑別品種及基因差異之依據，至於是否因而導致基因表現差異則有待進一步研究。利用 Translation (http://tw.expasy.org) 將核酸序列轉譯成氨基酸序列後，進一步與水稻及大豆(GST2)等十個物種之 GST 基因進行比較，其氨基酸一致性範圍介於 98-41％(Table 1)。

另將此二殖系氨基酸序列進行多序列排比，結果發現 GST70-1 較 GST11-1 於 C 端位置少 3 個氨基酸(Fig. 4)。由於氨基酸之改變即可能造成其立體結構或活化位置及受質辨識等發生變異，且 GST 蛋白質 C 端一般變異極大，為與各種疏水性物質結合之位置，稱 H 位(H site)(Dixon *et al*. 2002)。因此，推測此區域可能與受質之辨識有關，可能因此造成不同 GST 基因表現差異之重要位置。此外，由於 GST 需由相同或相異分子組成二元體後才具有酵素活性(Dixon *et al*. 2002)，故氨基酸之差異亦可能與蛋白質之間的辨識或結合相關。然而，目前有關基因 3'端非轉譯區之序列差異是否與基因調節有關，尚不清楚，仍需進一步之試驗探討。

```
GST70-1   --GCTTCGTTATCCTTCTTTTTTTCTC-----CTTGA--ACTCGAATATTCACTATGGCA
GST11-1   GATTTTCTTCATCCTTCTCTGTTCTCCTAGAACTTGATTACTTGAACATTCCCTATGACA
              *** * ******** * **   *     *****  *** *** **** ***** **

GST70-1   GATGAGGTGGTTCTGCTAGATTTCTGGCCAAGTCCATTTGGGATGAGGGTCAGGATTGCA
GST11-1   GATGAGGTGGTTCTTCTGGATTTCTGGCCAAGTCCATTTGGGATGAGGGTCAGGATTGCA
          ************** ** ******************************************

GST70-1   CTTGCTGAAAAGGGTATCAAATATGAGTCCAAAGAAGAGGACTTGCAGAACAAGAGCCCT
GST11-1   CTTGCTGAAAAGGGTATCGAATATGAGTACAAAGAAGAGGACTTGAGGAACAAGAGTCCT
          ****************** ********* ****************  ********* ***

GST70-1   TTGCTCCTCAAAATGAACCCGGTTCACAAGAAAATCCCGGTTCTCATCCACAATGGCAAA
GST11-1   CTTCTCTTACAAATGAACCCGGTTCACAAGAAGATTCCGGTTCTCATCCACAATGGCAAA
           * *** *  ********************** ** ************************

GST70-1   CCCATTTGTGAATCTCTCGTTGCTGTTCAGTACATTGAGGAGGTCTGGAATGACAGAAAT
GST11-1   CCCATTTCCGAATCCCTCATTGCTGTTCAGTACATTGAGGAGGTTTGGAATGACAGAAAT
          *******  ***** *** ************************* ***************

GST70-1   CCCTTGTTGCCTTCTGACCCTTACCAGAGAGCTCAGGCTAGATTCTGGGCTGACTTTGTT
GST11-1   CCCTTGTTGCCTTCAGACCCTTACCAGAGAGCTCAGGCTAGATTCTGGGCTGATTATGTT
          ************** ************************************** * ****

GST70-1   GACAATAAGATATTTGATCTTGGAAGAAAGATTTGGACATCAAAGGGAGAAGAAAAAGAA
GST11-1   GACATTAAGATACATGATCTTGGAAAGAAGATTTGGACATCAAAGGGAGAAGAAAAAGAA
          **** *******  ***********  *********************************

GST70-1   GCTGCCAAAAAGGAGTTCATAGAGGCCCTTAAATTATTGGAGGAACAGCTGGGAGACAAG
GST11-1   GCTGCCAAGAAGGAGTTCATAGAGGCCCTTAAATTGTTGGAGGAACAGCTGGGAGATAAG
          ******** ************************** ******************** ***

GST70-1   ACTTATTTTGGAGGAGACGATCTAGGTTTTGTGGATATAGCACTTATTCCATTCGACACT
GST11-1   ACTTATTTTGGAGGAGACAATATTGGTTTTGTGGATATAGCACTTGTTCCATTCTACACT
          ****************** ** * ********************* ******** *****

GST70-1   TGGTTCAA---------GACTTTTGGCAGCCTCAACATAGAGAGTGAGTGCCCCAAGTTT
GST11-1   TGGTTCAAAGTCTATGAGACTTTTGGCAGCCTCAACATTGAGAATGAGTGCCCCAGGTTT
          ********         ********************* **** *********** ****

GST70-1   GTTGCTTGGGCCAAGAGGTGCCTGCAGAAAGACAGTGTTGCCAGGTCTCTTCCTGATCAA
GST11-1   GTTGCTTGGGCCAAGAGGTGCCTACAGAAAGAGAGTGTTGCAAAGTCTCTTCCTGATCAG
          *********************** ******** ******** * ***************

GST70-1   CACAAGGTCTATGAGTTCATTATGGACATAAGAAAGAAGTTCGACATTGAGTAGGTT-CA
GST11-1   CACAAGGTCTATGAGTTCGTTGTGGAGATAAGAAAGAAGTTAGTCATCGAGTAGGTTTCA
          ****************** ** **** ************** * *** ********* **

GST70-1   TGTTGGATTTTAATAGCCATAGTGACGTATTGATCATTCTTGGCCTTTCAACTAAATAGT
GST11-1   TGTTGGATCTTAATAGCCATAGTGAAGTATTGGTCGTTCTTGACCTTTCAACTAAATAAT
          ******** **************** ****** ** ****** *************** *

GST70-1   ATTTGTGTAGTAAATTAAAGGCACTTGGATGTACCAAACTTCATGCTTTTTGTAGGAGTG
GST11-1   ATTTGTGTAATAAA---AAGGCATTTGGATGTGCCAAACTTCATGCTTTCTGTTGGATTG
          ********* ****   ****** ******** **************** *** *** **

GST70-1   CGTAGGTTTTAAAAATTTTCTGATGTATCTTTCATGTGTTTGTTGGTTTTGCAATAGAAT
GST11-1   TGTAGGTTTTAAAATTTTTCTGATGTATCTTTCATGTGTTTGTTGGTTTTGCAATAGAGT
           ************* ******************************************* *

GST70-1   ATTTCCTATATTATACATATATTTGAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GST11-1   ATTTTCCGTA-------------------AAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
          **** *  **                   *******************
```

Fig. 2. The nucleotide sequences of GST11-1 (AY382831) and GST70-1 (AY382832) of soybean were aligned by ClustalW of SDSC (Thompson *et al.* 1994) .

*** = identical or conserved in all sequences in the alignment. ▒ = the start and stop codon**

```
GST2       CTTGAATCTTCGTTATCCTTCTTTTTCTCTCCTTGAACTCGAATATTCACTATGGCAGAT
GST70-1           CTTCGTTATCCTTCTTTTTTTCTCCTTGAACTCGAATATTCACTATGGCAGAT
                  ******************* *********************************

GST2       GAGGTGGTTCTGCTAGATTTCTGGCCAAGTCCATTTGGGATGAGGGTCAGGATTGCACTT
GST70-1    GAGGTGGTTCTGCTAGATTTCTGGCCAAGTCCATTTGGGATGAGGGTCAGGATTGCACTT
           ************************************************************

GST2       GCTGAAAAGGGTATCAAATATGAGTCCAAAGAAGAGGACTTGCAGAACAAGAGCCCTTTG
GST70-1    GCTGAAAAGGGTATCAAATATGAGTCCAAAGAAGAGGACTTGCAGAACAAGAGCCCTTTG
           ************************************************************

GST2       CTCCTCAAAATGAACCCGGTTCACAAGAAAATCCCGGTTCTCATCCACAATGGCAAACCC
GST70-1    CTCCTCAAAATGAACCCGGTTCACAAGAAAATCCCGGTTCTCATCCACAATGGCAAACCC
           ************************************************************

GST2       ATTTGTGAATCTCTCGTTGCTGTTCAGTACATTGAGGAGGTCTGGAATGACAGAAATCCC
GST70-1    ATTTGTGAATCTCTCGTTGCTGTTCAGTACATTGAGGAGGTCTGGAATGACAGAAATCCC
           ************************************************************

GST2       TTGTTGCCTTCTGACCCTTACCAGAGAGCTCAGGCTAGATTCTGGGCTGACTTTGTTGAC
GST70-1    TTGTTGCCTTCTGACCCTTACCAGAGAGCTCAGGCTAGATTCTGGGCTGACTTTGTTGAC
           ************************************************************

GST2       AATAAGATATTTGATCTTGGAAGAAAGATTTGGACATCAAAGGGAGAAGAAAAAGAAGCT
GST70-1    AATAAGATATTTGATCTTGGAAGAAAGATTTGGACATCAAAGGGAGAAGAAAAAGAAGCT
           ************************************************************

GST2       GCCAAAAAGGAGTTCATAGAGGCCCTTAAATTATTGGAGGAACAGCTGGGAGACAAGACT
GST70-1    GCCAAAAAGGAGTTCATAGAGGCCCTTAAATTATTGGAGGAACAGCTGGGAGACAAGACT
           ************************************************************

GST2       TATTTTGGAGGAGACGATCTAGGTTTTGTGGATATAGCACTTATTCCATTCGACACTTGG
GST70-1    TATTTTGGAGGAGACGATCTAGGTTTTGTGGATATAGCACTTATTCCATTCGACACTTGG
           ************************************************************

GST2       TTCAAGACTTTTGGCAGCCTCAACATAGAGAGTGAGTGCCCCAAGTTTGTTGCTTGGGCC
GST70-1    TTCAAGACTTTTGGCAGCCTCAACATAGAGAGTGAGTGCCCCAAGTTTGTTGCTTGGGCC
           ************************************************************

GST2       AAGAGGTGCATGCAGAAAGACAGTGTTGCCAGGTCTCTTCCTGATCAACACAAGGTCTAT
GST70-1    AAGAGGTGCCTGCAGAAAGACAGTGTTGCCAGGTCTCTTCCTGATCAACACAAGGTCTAT
           ********* **************************************************

GST2       GAGTTCATTATGGGCATAAGAAAGAAGTTCGACATTGAGTAGGTTCATGTTGGATCTTAA
GST70-1    GAGTTCATTATGGACATAAGAAAGAAGTTCGACATTGAGTAGGTTCATGTTGGATTTTAA
           ************* ***************************************** ****

GST2       TAGCCACAGTGACGTATTGATCATTCTTGGCCTTTCAACTAAATAGTATTTGTGTAG-AA
GST70-1    TAGCCATAGTGACGTATTGATCATTCTTGGCCTTTCAACTAAATAGTATTTGTGTAGTAA
           ****** ************************************************** **

GST2       ATTAAAGGCACTTGGATGTACCAAACTTCATGCTTTTTGTAGGAGTGCGTAGGTTTTAAA
GST70-1    ATTAAAGGCACTTGGATGTACCAAACTTCATGCTTTTTGTAGGAGTGCGTAGGTTTTAAA
           ************************************************************

GST2       AATTTTCTGATGTATCTTTCATGTGTTTGTTGGTTTTGCAATAGAATATTTCCTATATTA
GST70-1    AATTTTCTGATGTATCTTTCATGTGTTTGTTGGTTTTGCAATAGAATATTTCCTATATTA
           ************************************************************

GST2       TACA------------AAAAAAAAAAAAAAAAA---
GST70-1    TACATATATTTGAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
           ****            *****************
```

Fig. 3. The nucleotide sequences of GST2（Y10820） and GST70-1（AY382832）of soybean CRWD variety were compared by ClustalW of SDSC (Thompson *et al.* 1994).
*** = identical in all sequences in the alignment. ▒ = the start and stop codon.**

Table 1. Comparison of amino acid sequences homology (%) of the soybean GST cDNA clone GST11-1 (AY382831) and GST70-1 (AY382832) with GST of the ten published species.

Species	GST11-1 Amino Acid Sequence Identity(%)	Accession number
Glycine max (Soybean，GST10)	100	AF243365
Carica papaya (Papaya)	74	AJ000923
Nicotiana tabacum (Tobacco)	74	X56266
Arabidopsis thaliana (Arabidopsis)	69	AF385691
Lycopersicon esculentum (Tomato)	69	AAF22647
Matricaria chamomilla (Chamomile)	68	BAB32446
Cichorium intybus x *Cichorium endivia* (Endive)	66	CAC24549
Zea mays (Corn)	58	CAB38120
Hordeum vulgare (Barley)	56	AAF23357
Oryza sativa (Rice)	50	AAC05216
Species	GST70-1 Amino Acid Sequence Identity(%)	Accession number
Glycine max (Soybean，GST2)	98	Y10820
Brassica juncea (Mustard)	60	CAA74197
Arabidopsis thaliana (Arabidopsis)	60	CAA10060
Lycopersicon esculentum (Tomato)	59	AAF22647
Matricaria chamomilla (Chamomile)	57	BAB32446
Carica papaya (Papaya)	57	CAA04391
Cichorium intybus x *Cichorium endivia* (Endive)	54	CAC24549
Mesembryanthemum crystallinum (Nasturitum)	51	AAC28101
Zea mays (Corn)	46	CAA73369
Oryza sativa (Rice)	41	AAC05216

Homology (%) of amino acid sequences was compared using the Blastp program (Swissprot database) of NCBI.

四、GST11-1 及 GST70-1 為第三群之 GST 基因

GST 酵素之命名或分群目前有不同的依據，而植物 GST 酵素則以 Droog *et al.* (1995)依據其序列保留性、免疫學及基因序列的 intron / exon 等特性，將植物的 GST 分成三群的方式最廣被採用：即第一群 GST 有兩個插入子(introns)，第二群有 9 個插入子，第三群僅有一個插入子。GST 酵素之作用為將由三個胺基酸 γ-Glu-Cys-Gly 所組成的穀胱苷肽(glutathione, GSH)的硫基與各種不同疏水性受質之親電中心(electrophilic centers)結合，達到解毒或隔離作用。GST 蛋白質的分子量約為 25~29 kDa，須由相同或相異分子組成二元體(dimer)才有功能。McGonigle *et al.* (2000)指出第三群 GST 有三個氨基酸 13-S、18-R 與 67-S 是完全保留的。為瞭解大豆已註冊的 GST 基因之氨基酸間的關聯性，利用 CLUSTAL W (http://workbench.sdsc.edu/CGI/BW.cgi)工具進行多序列排比(Fig. 5)，發現此三個氨基酸亦保留於 GST11-1 及 GST70-1 二殖系中。由於第三群 GST 於轉錄或轉譯過程易受植物荷爾蒙等因子影響(Droog *et al.* 1995)，而二殖系與 auxin 所誘導之菸草 GST 基因(AAA67894)亦具 73 % 一致性。因此，推論本試驗所選殖的 GST11-1 與 GST70-1 應同屬第三群的 GST 基因。

由阿拉伯芥、大豆、玉米之 GST 蛋白質立體結構資料分析，發現第 67 至 69 個胺

```
GST70-1    MADEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLQNKSPLLLKMNPVHKKIPVLIHN
GST11-1    MTDEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIEYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPVHKKIPVLIHN
           *:**************************:** *****:*******:**************
            -.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-

GST70-1    GKPICESLVAVQYIEEVWNDRNPLLPSDPYQRAQARFWADFVDNKIFDLGRKIWTSKGEE
GST11-1    GKPISESLIAVQYIEEVWNDRNPLLPSDPYQRAQARFWADYVDIKIHDLGKKIWTSKGEE
           ****.***:*******************************:** **.***:*********
           -.-.-.-.-.-.-    -------------------------------------------

GST70-1    KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDDLGFVDIALIPFDTWFK---TFGSLNIESECP
GST11-1    KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDNIGFVDIALVPFYTWFKVYETFGSLNIENECP
           ****************************.:*******:** ****   ********.***
           ------------------------------------------------------------

GST70-1    KFVAWAKRCLQKDSVARSLPDQHKVYEFIMDIRKKFDIE
GST11-1    RFVAWAKRCLQKESVAKSLPDQHKVYEFVVEIRKKLVIE
           :***********:***:***********:::****: **
           -------------
```

Fig. 4. The soybean amino acids sequences of GST11-1（AY382831） and GST70-1（AY382832） were aligned by ClustalW of SDSC.

- *** - single, fully conserved residue;**
- **: - conservation of strong groups;**
- **. - conservation of weak groups;**
- **- no consensus;**
- **‒ · ‒ - N-terminal domain;**
- **---- - C-terminal domain.**

基酸，分別為榖氨酸(glutamic acid)、絲氨酸(serine)、精氨酸(arginine)參與和 GSH 結合，稱為 G 位(G-site)(McGonigle *et al.* 2000)。G 位一般具有高度保留性；而與各種疏水性物質結合之 H 位(H site)，變異極大且位於 C 端(Dixon *et al.* 2002)。由於 G-site 可用來區別第一群或第三群的 GST，第三群的 GST 則可由白氨酸(Leu, L)取代精氨酸(Arg, R)(McGonigle *et al.* 2000)。由氨基酸之序列排比結果發現 GST11-1 及 GST70-1 均具有 G-site，且精氨酸(Arg, R)亦由白氨酸(Leu, L)取代(Fig. 5)。因此，綜合上述資料，顯示 GST11-1 及 GST70-1 兩殖系確為第三群 GST 家族之成員。

五、GST 蛋白質特性之探討與功能預測

上網使用 Compute pI / Mw tool 程式(Bjellqvist *et al.* 1993)分析 GST11-1 及 GST70-1 二殖系的蛋白質結構，其等電點 p*I* 分別為 5.73 及 5.59，分子量分別為 25.5 及 25.0 kDa。將已發表的玉米等六個物種之 GST 等電點及分子量歸納後，得到各物種 GST 的等電點是介於 5.37 (*Coccomyxa sp. PA*，綠藻類) 到 6.71 (*Euphorbia esula*，辣大戟)，而分子量則在 23.68 kDa (辣大戟) 到 26.00 kDa (阿拉伯芥，*Arabidopsis thaliana*)之間 (Table 2)。

利用 SDSC 網站中 RPSBLAST (Altschul *et al.* 1997) 的程式，分析 GST11-1 及 GST70-1 胺基酸序列之保留性 domain，顯

```
GST26A     -MAA-TQEDVKLLGIVGSPFVCRVQIALKLKGVEYKFLEENLGN---KSDLLLKYNPVHK
GST6       -MAA-TQEDVTLLGVVGSPFVCRVQIALKLKGIECKFLEENLAN---KSDLLLKSNPVYK
GST7       -MAA-NQEDVKLLGATGSPFVCRVQIALKLKGVQYKFLEENLRN---KSELLLKSNPVHK
GST8       -MAS-SQEEVTLLGATGSPFVCRVHIALKLKGVQYKYVEENLRN---KSELLLKSNPVHK
GST11      -MAS-SQEEVTLLGVVGSPFLHRVQIALKLKGVEYKYLEDDLNN---KSDLLLKYNPVYK
GST13      -MASYHEEEVRLLGKWASPFSNRVDLALKLKGVPYKYSEEDLAN---KSADLLKYNPVHK
GST17      MMGS---GDVKLLSFWVSPFGKRVEWALKLKGIEYEYIEEDIFN---KSNLLLQLNPVHK
GST20      -MGS---EEVKLLSFWVSPFGKRIEWALKLKGVEYEYIEEDIFN---KSSLLLELNPVHK
GST19      ---M---EEVKLIATHQSFPCARVEWALRIKGVEYEYLKEDLAN---KSSLLLQSNPVHK
GST70-1    -----MADEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLQN---KSPLLLKMNPVHK
GST2       -----MADEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLQN---KSPLLLKMNPVHK
GST11-1    -----MTDEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIEYEYKEEDLRN---KSPLLLQMNPVHK
GST10      -----MTDEVVLLDFWPSPFGMRVRIALAEKGIEYEYKEEDLRN---KSPLLLQMNPVHK
GST9       -----MADGVVLLDTWASMFGMRVRIALAEKGVEYEYKEENLRN---KSPLLLQMNPIHK
GST16      ---MEEEAKVVLLGARFSMFEMRVKIALAEKGIKYEYMEQDLTN---KSTLLQEMNPIHK
GST12      ---MAEQDKVILHGMWASPYAKRVELALNFKGIPYEYVEEDLRN---KSDLLLKYNPVHK
GST5       ---MSKSEDLKLLGGWFSPFALRVQIALNLKGLEYEVVEETLNP---KSDLLLKSNPVHK
GST25      MASASVGKELTLYSYWRSSCSHRVRIALNLKGLKYEYKPVNLLKGEQSRPEFLQLNPVG-
GST24      -------MAVKVYGPHCAS-TKRVLVCLVEKEVEFEVVPVDVTKGEQKDPEYLKLQPFG-
GST23      -------MKLKVYADRMSQPSRAVLIFCKVNGIDFEEIKVDLSKRQQLSPEFRAVNPLR-
                    : :     :     :      : :  :      :               :*.

GST26A     KVPVFVHNEQP-IAESLVIVEYIDETWK-NN-PILPSDPYQRALARFWSKFIDDKIVGAV
GST6       KVPVFIHNEKP-IAESLVIVEYIDETWK-NN-PILPSDPYQRSFARFWSKFIDDKIVGAS
GST7       KVPVFIHNEKP-IAESLVIVEYIDETWK-NN-PILPSDPYQRALARFWSKFIDDKVVGAA
GST8       KVPVFIHNEKP-IAESLVIVEYIDETWK-NN-PILPSDPYQRALARFWSKFIDDKVFGAA
GST11      MIPVLVHNEKP-ISESLVIVEYIDDTWK-NN-PILPSDPYQRALARFWAKFIDDKCVVPA
GST13      KVPVLVHNGNP-LPESLIIVEYIDETWK-NN-PLLPQDPYERALARFWSKTLDDKILPAI
GST17      KVPVLVHAHKP-IAESFIILEYIDETWK-QY-PLLPCHPHQRALARFWATSVEQKLGKAG
GST20      KVPVLVHAEKSIIAESFIILEYIDEKWK-QY-SLLPHHPYQRALARFWAATAEEMFRKVV
GST19      KVPVLLHNNKP-IAESLVILEYIDETWK-KN-PLLPLDPYERAQARFWARFIDEKCVLAV
GST70-1    KIPVLIHNGKP-ICESLVAVQYIEEVWN-DRNPLLPSDPYQRAQARFWADFVDNKIFDLG
GST2       KIPVLIHNGKP-ICESLVAVQYIEEVWN-DRNPLLPSDPYQRAQARFWADFVDNKIFDLG
GST11-1    KIPVLIHNGKP-ISESLIAVQYIEEVWN-DRNPLLPSDPYQRAQARFWADYVDIKIHDLG
GST10      KIPVLIHNGKP-ISESLIAVQYIEEVWN-DRNPLLPSDPYQRAQARFWADYVDIKIHDLG
GST9       KIPVLIHNGKP-ICESAIIVQYIDEVWN-DKAPILPSDPYERAQARFWVDYIDKKVYDTW
GST16      KIPVLIHHGRP-ICESLIIVEYIDMVWD-NNCPLLPSDPYHKAQARFWADFVDQKVYHAS
GST12      KVPVLVHNGKA-IAESMVILEYIDETWK-DGPKLLPSDSYKRAQARFWCHFIQDQLMEST
GST5       KIPVFFHGDKV-ICESAIIVEYIDEAWT-NVPSILPQNAYDRANARFWFAYIDEKWFTSL
GST25      CVPVLVDDHVV-LYDSFAIIMYLEDKYP-HN-PLLPHDIYKRAINFQAASVVSSTIQPLH
GST24      VVPVIKDGDYT-LYESRAIMRYYAEKYRSQGVELLGKTIEERGLVEQWLEVEAHNFHPQA
GST23      KVPAIVDGRFK-LFESHAILIYLASAFPGVADHWYPADLSRRARIHSVLDWHHQNLRRGA
            :*.: .      : :*   : *     :                 :.

GST26A     SKSVFT----------VDEKEREKNVEETYEALQFLENELK-----DKKFFGGEE--FGL
GST6       WKSVFT----------VDEKEREKNVEESLEALQFLENELQ-----DKRFFGGDE--FGF
GST7       WKYIYT----------VDEKEREKNVEESYEALQFLENELK-----DKKFFGGEE--IGL
GST8       WKSVFT----------ADEKEREKNVEEAIEALQFLENEIK-----DKKFFGGEE--IGL
GST11      WKSAFM----------TDEKEKEKAKEELFEALSFLENELK-----G-KFFGGEE--FGF
GST13      WNACWS-----------DENGREKAVEEALEALKILQETLK-----DKKFFGGES--IGL
GST17      WVAMS-----------TSGEEQEKAVKEAIEMMEKIEEEIK-----GKKFFGGDN--IGY
GST20      WIALRSP---------TSGDEREKALKESREVMERIEEEIR-----GKKYFGGDN--IGY
GST19      WGATV-----------AQGEEKEKAVGAALESLALLEKEIQ-----GKKYFGGEK--IGY
GST70-1    RKIWTS-----------KGEEKEAAKKEFIEALKLLEEQLG-----DKTYFGGDD--LGF
GST2       RKIWTS-----------KGEEKEAAKKEFIEALKLLEEQLG-----DKTYFGGDD--LGF
GST11-1    KKIWTS-----------KGEEKEAAKKEFIEALKLLEEQLG-----DKTYFGGDN--IGF
GST10      KKIWTS-----------KGEEKEAAKKEFIEALKLLEEQLG-----DKTYFGGDN--IGF
GST9       RKMWLS-----------KGEEHEAGKKEFISIFKQLEETLS-----DKAYYGSDT--FGF
GST16      KRVWIS-----------KGDEKEVAKKDFLESLKQLEEFLG-----DKPYFGGDT--FGF
GST12      FLVVKT-----------DGEAQQKAIDHVYEKLKVLEDGMKTYLGEGNAIISGVENNFGI
GST5       RSVLVA----------EDDEAKKPHFEQAEEGLERLEEVFN-KYSEGKAYFGGDS--IGF
GST25      NLSLLN-----------YIGEKVGPDEKLPWAQSIIRRGFK----ALEKLLKDHTGRYAT
GST24      YNLCLHGLFGSLFGVTPDPKVIEESEAKLVQVLNIYEERLS-----KTKYLAGDF--FSI
GST23      ASFVLNTVLAPLLGLRANQQAAAEAEKILISSLSTIENIWLK--GNGQYLLGGLR--PSI
                                                 .                .     .
```

```
GST26A     VDIAAVFIAFWIPIFQEIAGLQLFTSEKFPILYKWSQEFLNHPFVHEVLPPRDPLFAYFK
GST6       VDIAGVFIAFSIPIFQEVAGLQLFTSEKFPKLFKWSQELINHPVVKDVLPPREPLFAFFK
GST7       VDIAAVFIAFWIPIIQEVLGLKLFTSEKFPKLYKWSQEFINHPVVKQVLPPRDQLFAFYK
GST8       VDIAAVYIAFWVPMVQEIAGLELFTSEKFPKLHNWSQEFLNHPIVKESLPPRDPVFSFFK
GST11      VDIAAVLI----PIIQEIAGLQLFTSEKFPKLSKWSQDFHNHPVVNEVMPPKDQLFAYFK
GST13      VDIAANFIGYWVAILQEIAGLELLTIEKFPKLYNWSQDFINHPVIKEGLPPRDELFAFFK
GST17      LDIALGWIAYLVPVWEEVGSMQIIDPLKFPATTEWITNFLSHPLIKDSLPPRDKMLVYYH
GST20      LDIALGWISYWLPVLEEVGSMQIIDPLKFPATTAWMTNFLSNPVIKDNLPPRDKMLVYLK
GST19      LDIAAGCMSLWFSVLEELGEMELLNAERFPSLHEWSQNFLQTSPVKDCIPSRESVVEYFS
GST70-1    VDIALIPFDTWFK---TFGSLNIES--ECPKFVAWAKRCLQKDSVARSLPDQHKVYEFIM
GST2       VDIALIPFDTWFK---TFGSLNIES--ECPKFVAWAKRCMQKDSVARSLPDQHKVYEFIM
GST11-1    VDIALVPFYTWFKVYETFGSLNIEN--ECPRFVAWAKRCLQKESVAKSLPDQHKVYEFVV
GST10      VDIALVPFYTWFKVYETFGSLNIEN--ECPRFVAWAKRCLQKESVAKSLPDQHKVYEFVV
GST9       LDIGLIPFYSWFYTFETYGNFKMEE--ECPKLVAWAKRCMQREAVSKSLS----------
GST16      VDVALIPFYCWFYTYETFGNFKVEG--EYPKLISWAKRCMQKESVSETLADEREVYEAVL
GST12      LDIVFCALYGAYKAHEEVIGLKFIVPEKFPVLFSWLMAIAEVEAVKIATPPHEKTVGILQ
GST5       IDIGFGSFLSWMRVIEEMSGRKLLDEKKHPGLTQWAETFAADPAVKGILPETDKLVEFAK
GST25      GDEVFLADIFLAPQLHAAFKRFNIHMNEFPILARLHETYNEIPAFQEALPENQPDAVH--
GST24      ADISHLPFLDYVVN--NMGKKYLLE--ERKHVGAWWDDISSRPSWNKVLQLYRAPI----
GST23      ADLSLVCEIMQLELLDEKDRDRILGPHKKVQQWIESTRNATRPHFDEVHTILYKLKTRLS
            *                         .

GST26A     ARY-------ESLSASK------
GST6       SLY-------ESLSASK------
GST7       ACH-------ESLSASK------
GST8       GLY-------ESLFGSK------
GST11      ARA-------QSFVAKRKN----
GST13      ASA-------KK-----------
GST17      NRKNNLPSVFRNLVKD-------
GST20      DLRS------KYIVL--------
GST19      FGIN----YVRSLAASSKS----
GST70-1    DIR-------KKFDIE-------
GST2       GIR-------KKFDIE-------
GST11-1    EIR-------KKLVIE-------
GST10      EIR-------KKLVIE-------
GST9       -----------------------
GST16      DYK-------NKFILN-------
GST12      LFR------LSALKSSSATE---
GST5       ILQLK----WTAAAAAAAK----
GST25      -----------------------
GST24      -----------------------
GST23      EQQSNQADGVMQSRIRTPLNSKM
```

Fig. 5. The soybean amino acids sequences of type III GST were aligned by ClustalW of SDSC.
G-site；▼ Consensus sequences of type III GST.
GST 25 （AAG34815）, GST 24（AAG34814）, GST 23 （AAG34813）, GST 20 (AAG34810), GST 19 (AAG34809), GST 17 （AAG34807）, GST 16 （AAG34806）, GST 13 (AAG34803), GST 12 (AAG34802), GST 11 （AAG34801）, GST 10 （AAG34800）, GST 9(AAG34799), GST 8 （AAG34798）, GST 7 （AAG34797）, GST 6 （AAG34796）, GST 5 （AAG34795）, GST2（Y10820） and, GST26A（AAA33973）are registered GST sequences of soybean used for sequence analysis in this experiment.

示二殖系均具有 GST 保留之 N 端及 C 端 domain，其功能在於將 GSH 與各種目標物形成聚合物(Fig. 4)。在蛋白質功能預測方面，由於玉米的 *Bz2* 基因可互補於阿拉伯芥的突變體(Dong *et al*. 2001)；矮牽牛與玉米之 GST 酵素也同樣有互補性(Alfenito *et al*. 1998)，證明參與類黃酮合成的 GST 基因之功能具有保留性。目前已知 *Bz2*、*GSTIII*(玉

Table 2. Calculation of the relative molecular masses (Mr) and isoelectric points (*pI*) of glutathione S-transferase (GST) using the p*I*/Mw program of ExPASy.

Source of GST[a]	Number of amino acids	Mr (kDa)	*pI*
Glycine max (Soybean；GST11-1)	219	25.5	5.73
Glycine max (Soybean；GST70-1)	216	25.0	5.59
Lycopersicon esculentum (Tomato)	220	25.4	6.03
Euphorbia esula (leafy spurge)	213	23.6	6.71
Arabidopsis thaliana (Arabidopsis)	224	26.0	5.44
Coccomyxa sp. PA (Halimediaceae)	215	23.9	5.37
Zea mays (Corn)	223	24.5	5.77

[a] *Lycopersicon esculentum* (AAF22647), *Euphorbia esula* (AAF65767), *Arabidopsis thaliana* (AAD34992), *Coccomyxa* sp. PA (AAC50036), *Zea mays* (CAA56047).

米)、*GST26A*(大豆)及 *AN9*(矮牽牛)基因扮演的角色為轉移花青素之 GST，其中大豆 *GST26A* 因氨基酸序列與 *Bz2* 具一致性(36%)且同屬第三群，故作為 *bz2* 突變體之轉殖基因，因而確認其具有轉移花青素之功能。所以，本試驗將 *Bz2* 與 GST11-1 和 GST70-1 二殖系之氨基酸序列進行多序列排比，結果發現 *Bz2* 分別與 GST11-1 及 GST70-1 具 33 與 36 % 之一致性，與大豆 *GST26A* 基因所得之結果相似。

McGonigle *et al.*(2000) 進行生體外 GST 蛋白質活性之試驗，發現大豆 GST2、GST4 及 GST10 之氨基酸序列差異小於 15 %，但與不同受質結合之活性之差異甚大。因此，由序列相似性所作的分群與 GST 的功能性並非是絕對吻合的，即使為同一群之 GST，其活性亦可能相差甚大，因此無法單自群別預測其功能，是否與花青素轉移相關，仍需由蛋白質功能試驗來證明。而 Alfenito *et al.*(1998)亦指出由序列相似性並無法直接預測 GST 是否以花青素為受質。由於無更進一步的實驗證明 GST 可將花青素與 GSH 形成複合物，因此 Mueller *et al.*(2000)利用 GST 與花青素及 GSH 共培養，發現 GSH 濃度並未隨之減少，證實 *AN9* 和 *Bz2* 與 GSH 並無結合。而花青素與 GST 結合不僅可避免細胞內的蛋白質被氧化，亦可保護其自身免遭氧化(Ahmed *et al.* 1994, Alfenito *et al.* 1998)。所以，Alfenito *et al.*(1998)認為 GST 酵素應是擔任細胞質中花青素的"護衛"(escort)作用，不須將花青素與 GSH 結合成複合物，即可達到隔離作用，且 GST 可能是擔任細胞內化合物之攜帶蛋白質。

本試驗以黑色種皮大豆(基因型為 *iRT*)之不同生育時期，種皮總量 RNA 20 μg，進行北方雜交反應，結果發現此二個 GST 殖系於六個生育時期均有表現，估計其大小約為 970 bp (Fig. 6)。由競爭型 RT-PCR 之結果顯示，GST11-1 及 GST70-1 在 UC1(*IRT*)、UC9(*iRT*)、UC14(*irT*)不同基因型 Clark 品系之種皮均有表現(Fig. 7)，而在不同組織之北方雜交分析結果顯示，此二 GST 殖系在花及豆莢組織並未表現或表現量很低(Fig. 8)。雖然，GST 二殖系於種皮(主為花青素分子)中有頗高的表現量，但在花組織中(亦有花青素產生)卻無法偵測。由於在大豆 EST 基因庫中尚有其他 GST 的殖系

存在，其功能也未被瞭解，因此在花組織中是否另有組織特異表現之 GST 基因存在，扮演轉移花青素之角色仍有待研究。目前有關植物 GST 之研究並不如動物方面之透徹，而大豆 GST 進一步之生理或生化功能分析亦不足。因此為了解 GST11-1 及 GST70-1 生物性功能，未來將構築蛋白質表現載體，生產、純化兩殖系之蛋白質，分別與花青素分子進行共培養，再以高效率液相層析技術 (HPLC)或薄層色層分析 (TLC) 分析方法檢視 GST 是否與色素結合或是有聚合物產生或具有受質特異性存在，此外，亦可靜默 (silence) 此二基因之表現，觀察其外表型之變化，再將兩基因轉殖至 GST 突變體視其是否有回復體產生，以證明此兩殖系之功能是否與大豆花青素之轉移直接有關。

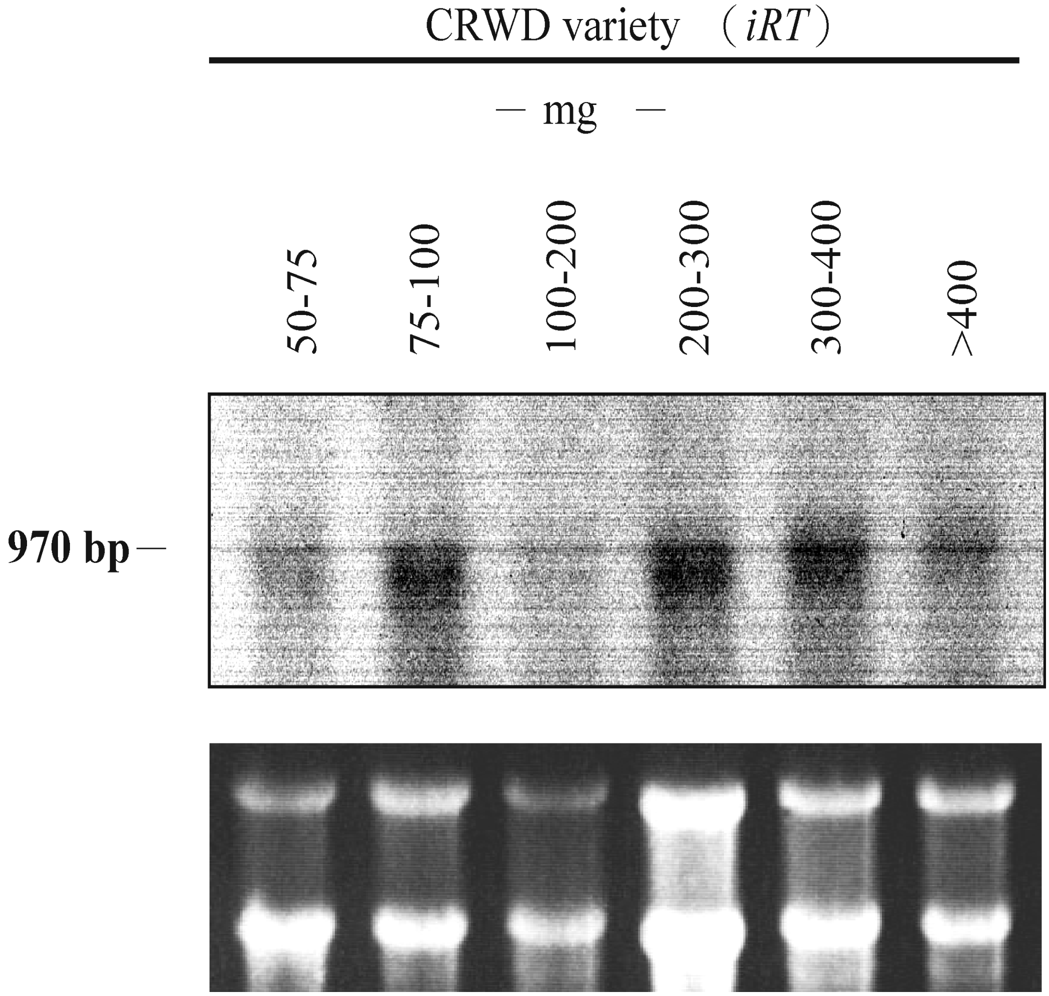

Fig. 6. Northern analysis of soybean GST gene expressed during developmental stage of seed coats of CRWD variety hybridized with GST420 probe. Seed coat size (mg/fresh weight) is used to describe seed developmental stage.

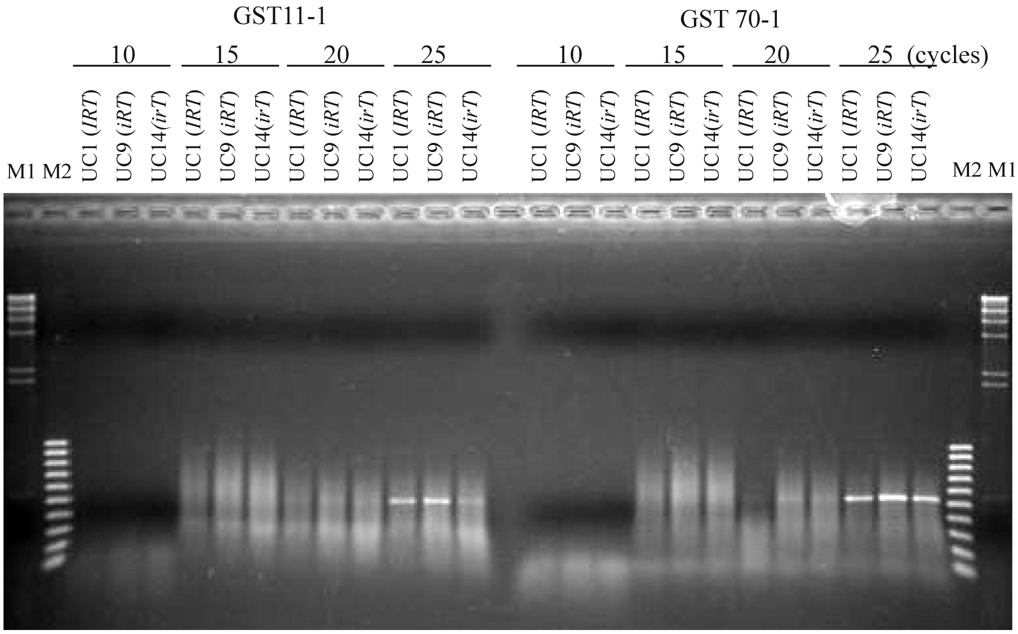

Fig. 7. The amplification of soybean Clark isogenic lines by competitive RT-PCR with various (10-25) cycles using RNA prepared from young seed coats (200-400 mg seed^{-1}). M1: λ /*HindIII* marker, M2: 100 bp ladder marker.

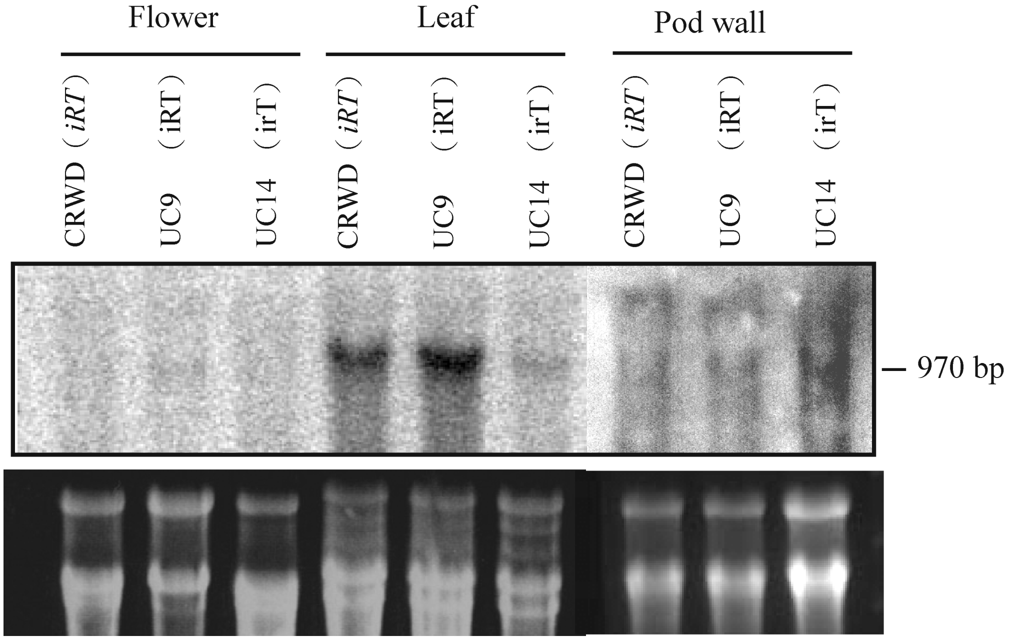

Fig. 8. Northern analysis of the GST genes expressed in flower, fully expanded leaves, and full size pod wall of CRWD variety hybridized with GST420 cDNA probe.

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會農業試驗所之計畫經費(91 農科-4.1.2-農-C1)支持，特此致謝。

引用文獻

Ahmed MS, K Ainley, JH Parish, SM Hadi (1994) Free radical-induced fragmentation of proteins by quercetin. **Carcinogenesis** 15:1627-1630.

Alfenito M, E Souer, CD Goodman, R Buell, J Mol, R Koes, V Walbot (1998) Functional complement-tation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione *S*-transferases. **Plant Cell** 10:1135-1149.

Altschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402.

Bjellqvist B, GJ Hughes, Ch Pasquali, N Paquet, F Ravier, JC Sanchez, S Frutiger, DF Hochstrasser (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis** 14:1023-1031.

Buzzell RI, BR Buttery (1982) Genetics of black pigmentation of soybean seed coats/hila. **Soybean Genet. Newsl.** 9:26-29.

Buzzell RI, BR Buttery, DC MacTavish (1987) Biochemical genetics of black pigmentation of soybean seed. **J. Hered.** 78:53-54.

Chung CT, SL Niemela, RH Miller (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 86:2172-2175.

Dixon DP, A Lapthorn, R Edwards (2002) Plant glutathione transferases. **Genome Biol.** 3：3004.1-3004.10.

Dong X, EL Braun, E Grotewold (2001) Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. **Plant Physiol.** 127:46-57.

Droog FNJ, PJJ Hooykaas, KR Libbenga, EJ Zaal (1995) Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione *S*-transferases and one member indeed shows *in vitro* GST activity. **Plant Mol. Biol.** 21:965-972.

Edwards R, DP Dixon, V Walbot (2000) Plant glutathione *S*-transferases：enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends Plant Sci.** 5:193-198.

Edwards R, DP Dixon (2000) The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. p.33-71. *In*: Herbicides and Their Mechanisms of Action. AH Cobb, RC Kirkwood (eds.) Sheffield Academic Press, Sheffield.

Zabala G, L. Vodkin (2003) Cloning of the pleiotropic *T* locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3′ hydroxylase. **Genetics** 163:295–309

Marrs KA, MR Alfenito, AM Lloyd, V Walbot (1995) A glutathione *S*-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. **Nature** 375:397-400.

McGonigle B, SJ Keeler, SC Lau, MK Koeppe, DP 'Okeefe (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione *S*-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiol.** 124:1105-1120.

Mueller LA, CD Goodman, RA Silady V Walbot (2000) AN9, a petunia glutathione *S*-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiol.** 123:1561-1570.

Murray V (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Res.** 17:8899.

Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Thompson JD, DG Higgins, TJ Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment

through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680.

Wang CS, JJ Todd, LO Vodkin (1994) Chalcone synthase mRNA and activity are reduced in yellow soybean seed coats with dominant *I* alleles. **Plant Physiol.**105:739-748.

Wang CS, L Vodkin (1994) Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. **Plant Mol. Bio. Rep.** 12:132-145.

Wilce MCJ, MW Parker (1994) Structure and function of glutathione *S*-transferases. **Biochim Biophys Acta** 1205:1-18.

Williams LF (1952) The inheritance of certain black and brown pigments in the soybean. **Genetics** 37:208-215.

Zhou C, Y Yang, AY Jong (1990) Mini-prep in ten minutes. **Bio/Techniques** 8: 172.

－編輯：楊純明